

PCT/JP 03/13486

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

22.10.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

2002年10月22日

RECEIVED
12 DEC 2003

出願番号
Application Number:

特願2002-307232

WIPO PCT

[ST. 10/C]: [JP 2002-307232]

出願人
Applicant(s):

科学技術振興事業団

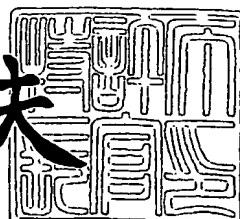
**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年11月27日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願
【整理番号】 NP02384-SH
【提出日】 平成14年10月22日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 A61K 31/702
A61K 31/715
A61K 39/00
A61P 31/12
【発明の名称】 パラグロボシドを有効成分とするデング熱ウィルス
感染阻害剤
【請求項の数】 4
【発明者】
【住所又は居所】 静岡県静岡市瀬名1丁目8番3-102
【氏名】 鈴木 康夫
【発明者】
【住所又は居所】 静岡県清水市川原町21-11-402
【氏名】 左 一八
【特許出願人】
【識別番号】 396020800
【氏名又は名称】 科学技術振興事業団
【代理人】
【識別番号】 100093230
【弁理士】
【氏名又は名称】 西澤 利夫
【電話番号】 03-5454-7191
【手数料の表示】
【予納台帳番号】 009911
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0013341

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 パラグロボシドを有効成分とするデング熱ウィルス感染阻害剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 少なくとも、次式（I）

$\text{Gal} \beta 1\text{-}4\text{GlcNAc} \beta 1\text{-}3\text{Gal} \beta 1\text{-}4\text{Glc} \beta 1\text{-}$ (I)

で表されるパラグロボシドを必須構成要素として有する糖質分子を有効成分として含有することを特徴とするデング熱ウィルス感染阻害剤。

【請求項 2】 少なくとも、次式（II）

$\text{Gal} \beta 1\text{-}4\text{GlcNAc} \beta 1\text{-}3\text{Gal} \beta 1\text{-}4\text{Glc} \beta 1\text{-R}$ (II)

(ただしRは水素原子、S、N、O、P原子を有する置換基、炭化水素基、脂質、タンパク質、および合成高分子からなる群より選択される基質であり、いずれの場合にも置換基を有していてよい)

で表される分子を有効成分として含有することを特徴とするデング熱ウィルス感染阻害剤。

【請求項 3】 次式（I）

$\text{Gal} \beta 1\text{-}4\text{GlcNAc} \beta 1\text{-}3\text{Gal} \beta 1\text{-}4\text{Glc} \beta 1\text{-}$ (I)

で表されるパラグロボシドに対するモノクローナル抗体。

【請求項 4】 少なくとも請求項3のモノクローナル抗体を有効成分として含有することを特徴とするデング熱ウィルス感染阻害剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この出願の発明は、デング熱ウィルス感染阻害剤に関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、少なくともパラグロボシド糖鎖を必須構成要素として有する糖質分子を有効成分として含有するデング熱ウィルス感染阻害剤に関するものである。

【0002】

【従来技術とその課題】

デング熱 (dengue fever) は、デングウィルス (dengue virus) の急性感染症

で、その臨床的特徴から、予後良好な古典的デング熱（classical dengue fever : CDF）、出血傾向を示すデング出血熱（dengue hemorrhagic syndrome: DHF）、最も重篤でショックを特徴とするデングショック症候群（dengue shock syndrome: DSS）に分類される（非特許文献1）。

【0003】

CDFは、3～9日の潜伏期間の後、40℃前後の発熱、頭痛、腰背部痛、顔面紅潮、結膜充血などを突然発症し、全身の激しい関節痛と筋肉痛を伴う疾患である（非特許文献2）。また、やや遅れて、消化器症状や上気道炎症も出現する。しかし、これらの症状は、自己限定期であり、自然経過で治癒・回復する。一方、DHF/DSSもCDFとほぼ同様に発症するが、2～6日で出血傾向もしくはショック様症状が著明となり、虚脱感や全身衰弱が激しく、状態が急速に悪化する点で異なる（非特許文献3、4）。

【0004】

デング熱の病原体であるデングウイルスは、直径約40～60 nmでエンベロープを有し、約11 kbのプラス極性の1本鎖RNAを有し、ウィルス学的には黄熱ウイルスや日本脳炎ウイルスなどとともにフラビウイルス科（Flaviviridae）に属する。また、デングウイルスは、感染中和抗体の交叉性に基づいて1～4型の4種の血清型に分類されることが知られている（非特許文献5、6）。

【0005】

自然界におけるデングウイルスベクターは、シマカ類の蚊であり、中でも熱帯地方に広く生息するネッタイシマカ（Aedes aegypti）が主要な媒介蚊となってい（非特許文献7）。都市部では、ウィルス保有蚊の刺咬によってヒトが感染し、逆にウィルス血症を呈している患者を刺咬して蚊がウィルスを獲得するという蚊—ヒト—蚊の生活環が成立しており、人口のまばらな森林地帯では、蚊とサル類によってサイクルが成立していると考えられている（非特許文献8）。

【0006】

デング熱は、世界各地の熱帯地方に広く分布しており、感染力が極めて強く、流行時には人口の約80%が感染することが知られている。地球上の患者は2000万人／年（WHO）にもおよび、流行地域も患者数も年毎に拡大の一途をたどってい

る（非特許文献9）。また、かつては見られなかったDHF/DSSが、近年各地で多発しており、出血熱の致死率が40%以上と高いことからも、この症状は、再興感染症として位置付けられ、その対策は公衆衛生上極めて重要な問題となっている。

【0007】

しかし、感染における標的組織、感染初期過程の宿主・ウィルス相互作用に関する分子、遺伝子の情報は極めて少なく、デング熱、デング出血熱に有効な薬は未だ知られていないのが実情である。デング熱ワクチンについても、弱毒性ワクチンを始め、不活性ワクチン、サブユニットワクチン、組み換えワクチン、DNAワクチンなどの開発が進められてはいるものの、有効性や副反応の問題により実用化には達していない（非特許文献10）。

【0008】

例えば、これまでに、リバビリン（Ribavirin）が毒性RNAウィルス感染に対して効能を示すことが報告され、デング熱ウィルスに対する有効な薬剤として作用することが期待された（非特許文献11）。しかし、アカゲザルを用いたデングウィルス感染において、リバビリンは予防効果を示さず、反対に貧血や血小板増加症を誘発したことが報告されている（非特許文献12）。また、これまでに細胞表面にあるヘパリン様グリコサミノグリカン、ヘパラン硫酸がデング熱ウイルスの受容体として、その外皮蛋白質と結合することが明らかにされ、この結合を阻害する物質がデング熱ウイルスの感染の治療薬として有望視されている（非特許文献13）。しかし、この分子のみではデング熱ウイルスの宿主特異性を説明することができないことから、他のレセプター構成分子が存在することが予想されている。

【0009】

さらに、デング熱は、ウィルス抗体により感染が助長される例が多く報告されており、抗原・抗体複合体、Fcレセプターの関与なども考えられているが、詳細な機構については不明である（非特許文献14、15）。デング熱ウイルスの受容体研究の多くは、宿主固体、細胞レベルで行われているが、未だ分子、遺伝子レベルでは解明されていない。デング熱ウイルスのヒトにおける標的細胞は、

血球系に存在していると予想されているが（例えば非特許文献16）、受容体分子は未同定である。

【0010】

【非特許文献1】

平林義弘、「感染症症候群 I 領域別症候群シリーズNo.23」，1999年，p. 145-149

【非特許文献2】

サビン，A. B. (Sabin, A.B.)，「アメリカン ジャーナル オブ トロピカル メディシン アンド ハイジーン (American Journal of Tropical Medicine and Hygiene)」（米国），1952年，第2巻，p. 30-50

【非特許文献3】

コーベン，S. N. (Cohen, S.N.) 他1名，「ジャーナル オブ ピーディアトリックス (Journal of Pediatrics)」（米国），1966年，第68巻，p. 448-456

【非特許文献4】

ニマニティア，S. (Nimmannitya, S.) 他3名，「アメリカン ジャーナル オブ トロピカル メディシン アンド ハイジーン (American Journal of Tropical Medicine and Hygiene)」（米国），1969年，p. 954-971

【非特許文献5】

ウェスタウェイ，E. G. (Westaway, E.G.) 他9名，「インターヴィロロジー (Intervirology)」（スイス），1985年，第24巻，p. 183-192

【非特許文献6】

チャンバース，T. J. (Chambers, T.J.) 他3名，「アニュアル レビューズ マイクロバイオロジー (Annual Reviews Microbiology)」（米国），1990年，第44巻，p. 649-688

【非特許文献7】

バンクロフト，T. L. (Bancroft, T.L.)，「オーストラレージアン メディカル ガゼット (Australasian Medical Gazette)」（オーストラリア）

, 1906年, 第25巻, p. 17-18

【非特許文献8】

ガブラー, D. J. (Gubler, D.J.) , 「ザ アルボバイラセス: エコロジー アンド エピデミオロジー ボリューム 1 (The Arboviruses: Ecology and Epidemiology) Vol.2」 (米国), 1988年, シー アール シー プレス (CRC Press) , p. 223-260

【非特許文献9】

リガウーペレス, J. G. (Rigau-Perez) 他5名, 「ザ ランセット (The Lancet)」 (イギリス), 1998年, 第352巻, p. 971-977

【非特許文献10】

チェンバース, T. J. (Chambers, T.J.) 他3名, 「バクシーン (Vaccine)」 (米国), 1997年, 第15巻, p. 1494-1502

【非特許文献11】

キャノニコ, P. G. (Canonico, P.G.) 「アンタイバイラル リサーチ (Antiviral Research)」 (米国), 1985年, 増刊号1巻, p. 75-81

【非特許文献12】

マリノスキ, F. J. (Malinoski, F.J.) 他2名, 「アンタイバイラル リサーチ (Antiviral Research)」 (米国), 1990年, 第13巻, 第3号, p. 139-150

【非特許文献13】

マルクス, R. M. (Marks, R.M.) 他7名, 「ジャーナル オブ メディシナル ケミストリー (Journal of Medicinal Chemistry)」 (米国), 2001年, 第44巻, 第13号, p. 2178-2187

【非特許文献14】

シュレシンガー, J. J. (Schlesinger, J.J.) 他1名, 「バイロロジー (Virology)」 (米国), 1999年, 第260巻, p. 84-88

【非特許文献15】

ワン, S. (Wang, S.) 他4名, 「バイロロジー (Virology)」 (米国), 1995年, 第213巻, p. 254-257

【非特許文献16】

チエン, Y. C. (Chen, Y.C.) 他2名, 「ジャーナル オブ バイロロジー (Journal of Virology)」 (米国), 1999年, 第73巻, p. 2650-2657

【0011】

そこで、この出願の発明は、以上のとおりの問題点を解決し、デング熱ウィルスの感染を効果的に阻害する薬剤を提供することを課題としている。

【0012】

【課題を解決するための手段】

この出願の発明は、以上のとおりの課題を解決するものとして、まず、第1には、少なくとも、次式(I)



で表されるパラグロボシドを必須構成要素として有する糖質分子を有効成分として含有することを特徴とするデング熱ウィルス感染阻害剤を提供する。

【0013】

また、この出願の発明は、第2には、少なくとも、次式(II)



(ただしRは水素原子、S、N、O、P原子を有する置換基、炭化水素基、脂質、タンパク質、および合成高分子からなる群より選択される基質であり、いずれの場合にも置換基を有していてよい)で表される分子を有効成分として含有することを特徴とするデング熱ウィルス感染阻害剤を提供する。

【0014】

この出願の発明は、さらに、第3には、次式(I)



で表されるパラグロボシドに対するモノクローナル抗体と、第4には、少なくともこのモノクローナル抗体を有効成分として含有することを特徴とするデング熱ウィルス感染阻害剤をも提供する。

【0015】

【発明の実施の形態】

この出願の発明者らは、デング熱を引き起こすデング熱ウィルスの宿主がヒトと蚊に限定されているという点に注目し、この2種の生物が共通して有する受容体分子を突き止めるべく鋭意研究を進めた。そして、ウィルスが感染・増殖できる培養細胞（K562細胞：ヒト骨髓性白血病細胞株）を用いて、受容体が脂質である可能性、タンパク質である可能性、これらの糖鎖付加体である可能性について、生化学的、免疫学的、細胞生物学的手法により検討したところ、デング熱ウィルスのレセプターの検索と同定に成功し、本願発明に至ったものである。

【0016】

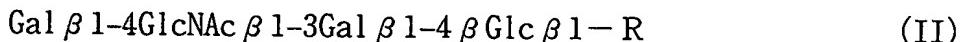
すなわち、この出願の発明のデング熱ウィルス感染阻害剤は、次式（I）



で表されるパラグロボシドを必須構成要素として有する糖質分子を有効成分として含有するものである。このような糖質分子は、パラグロボシドを有していればよく、多糖類に限定されず、糖脂質や糖タンパクであってもよい。

【0017】

また、この出願の発明のデング熱ウィルス感染阻害剤は、有効成分として、上記のパラグロボシド部位が、例えば炭化水素基、合成高分子、脂質、タンパク質等の合成化合物や天然化合物に結合した物質、すなわち、



（ただしRは水素原子、S、N、O、P原子を有する置換基、炭化水素基、脂質、タンパク質、および合成高分子からなる群より選択される基質であり、いずれの場合にも置換基を有していてよい）で表される物質を有効成分として含有するものであってもよい。

【0018】

このとき、Rとしては、具体的には、H、置換基を有していてよいC₁₋₂₀アシル基、置換基を有していてよいC₁₋₂₀アルキル基、ラクチル基、アミノ基、ヒドロキシル基、硫酸基、リン酸基等の置換基や、ポリエチレングリコール、ポリグルタミン酸等の高分子鎖、デンドリマー、ポリペプチド、あるいはグリセリン、セラミド等の脂質、アルブミン、フェツイン、トランスフェリン等の血清糖タンパク質、DNAなどが好ましく例示される。中でも、ヒトに対する毒性が低

いグリセリン、セラミド等の脂質、あるいは血清糖タンパク質をRとして用いることにより、安定で扱いの容易なデング熱ウィルス感染阻害剤の有効成分を得ることができる。また、Rは β GluのC1位に結合していればよく、Rのどの位置で、どのような形態で β GluのC1炭素と結合していてもよい。

【0019】

この出願の発明のデング熱ウィルス感染阻害剤は、発明者らにより明らかにされた、デングウィルスがパラグロボシドを特異的に認識・結合するという性質を利用するものである。したがって、パラグロボシドに対するモノクローナル抗体を公知の生物学的手法により製造すれば、このようなモノクローナル抗体もまた、デング熱ウィルス感染阻害剤の有効成分として作用する。

【0020】

また、以上のとおりのデング熱ウィルス感染阻害剤において、有効成分として用いられるパラグロボシドを必須構成要素として有する糖質分子やパラグロボシド部位を有する物質、あるいはパラグロボシドに対するモノクローナル抗体以外の成分の組成や、医薬品としての形態はとくに限定されない。パラグロボシドへのデングウィルスの結合を阻害しない限り、各種の成分を含有していてもよく、その投与形態もとくに限定されない。具体的には、錠剤、粒・散剤、シロップ剤等の形態での経口投与、注射剤等の形態での非経口投与、座薬等の形態での直腸投与など患者の症状や状態に応じた投与方法を選択することができる。

【0021】

この出願の発明のデング熱ウィルス感染阻害剤を経口投与する場合には、錠剤、トローチ、カプセル、霊薬、粉末、顆粒、懸濁液、乳液、およびシロップ等の形態とすることができます。また、被覆粒子、多層錠剤あるいは微小顆粒等として、緩慢放出または遅延放出される形態としてもよい。これらの形態においては、デング熱ウィルス感染阻害剤は、パラグロボシドを必須構成要素として有する糖質分子やパラグロボシド部位を有する物質、あるいはパラグロボシドに対するモノクローナル抗体とともに、薬学認容性の結合剤、甘味料、崩壊剤、希釈剤、人工香味料、被覆剤、保存剤、潤滑剤および／または効果遅延剤等を含有していてもよい。

【0022】

非経口投与では、有効成分であるパラグロボシドを必須構成要素として有する糖質分子やパラグロボシド部位を有する物質、あるいはパラグロボシドに対するモノクローナル抗体は、毒性を有さず、非経口的に認容される希釈剤や溶媒、具体的には、無菌の水溶液、または油性溶液、あるいは懸濁液中で調製してもよい。

【0023】

この出願の発明のデング熱ウイルス感染阻害剤では、有効成分であるパラグロボシドを必須構成要素として有する糖質分子、パラグロボシド部位を有する物質、およびパラグロボシドに対するモノクローナル抗体は、座薬等の形態で直腸投与されるものであってもよい。好適な座薬は、活性物質を常温では固体で直腸では融解する非刺激性の賦形剤と混合することによって調製してもよい。

【0024】

この出願の発明のデング熱ウイルス感染阻害剤は、さらに、あまり一般的ではないものの、吸入スプレーや軟膏等の経皮投与用形態を有するものであってもよい。例えば、吸入スプレーは、溶液、懸濁液または乳状液とし、二酸化炭素や一酸化二窒素等の低毒性の吸入可能な噴霧剤を含んでもよい。一方、経皮投与用としては、クリーム、軟膏、ジェル、ゼリー、チンキ、懸濁液または乳状液の形態が好ましく挙げられる。これらは、薬学認容性の結合剤、希釈剤、崩壊剤、保存剤、潤滑剤、分散剤、懸濁剤および／または乳化剤を含有してもよい。

【0025】

この出願の発明のデング熱ウイルス感染阻害剤は、一般的に知られる各種の方法によって製造されてもよい。例えば、有効成分であるパラグロボシドを必須構成要素として有する糖質分子あるいはパラグロボシド部位を有する分子、さらには、パラグロボシドに対するモノクローナル抗体を1種以上の好適なキャリア、補助剤、希釈剤または賦形剤と共にすりつぶす、粉碎する、ブレンドする、分散する、溶解する、懸濁する、混合する、混和する、組合せる、乳化する、またはホモジネートすることによって調製される。またこれらのステップを1以上組合せて製造されるものであってもよい。

【0026】

この出願の発明のデング熱ウィルス感染阻害剤において、有効成分の含有量はとくに限定されない。例えば、有効成分としてのパラグロボシドを必須構成要素として有する糖質分子やパラグロボシド部位を有する分子、あるいはパラグロボシドに対するモノクローナル抗体の濃度が500～1000 mg/人/日となるように配合することができる。もちろん、患者への投与量は、患者の年齢、性別、体重などを考慮して主治医の診断により患者の症状、状態に応じて決定されるべきものである。好ましくは、患者の体重に応じて10～100 mg/kgの範囲で投与することが望ましい。

【0027】

以上のとおりのこの出願の発明のデング熱ウィルス感染阻害剤は、デング熱症状の発症を抑制する目的で、デング熱ウィルスに感染した恐れのある患者に対して、感染初期の段階で投与できる。また、この出願の発明のデング熱ウィルス感染阻害剤を、デング熱症状を示す患者に投与すれば、デング熱の治療も可能となる。さらに、この出願の発明のデング熱ウィルス感染阻害剤は、デング熱流行地域の住民や流行地域への渡航者に対して投与することにより、デング熱ウィルスへの感染予防剤としても効果的に作用する。

【0028】

以下、実施例を示してこの出願の発明についてさらに詳細に説明する。もちろん、この出願の発明は、以下の実施例に限定されるものではないことはいうまでもない。

【0029】**【実施例】**

<実施例1> K562細胞からのDengue virus結合性脂質の単離・精製

(1) 中性糖脂質の単離・精製

K562細胞 (T-225フラスコ 26本分) に冷PBS(-) 0.5 mlを加え懸濁し、4℃で遠心した。得られたペレットに5 mlの精製水を加えてよく懸濁し、次にCHCl₃/MeOH (1/1, by vol.) を100 ml加え、攪拌しながら1時間、総脂質の抽出を行った。抽出液をろ過し、残渣に対して同じ処理を再度行い、得られたろ液をあわせてナ

ス型フラスコに移し、溶媒を除去した。乾固した総脂質画分にMeOH 30 mlを加え、超音波処理を5分間行った後、10 N NaOH 300 μ lを加え37°Cで一晩インキュベートした。

【0030】

反応終了後、1 N AcOH 3 mlを加え、よく懸濁し、超音波処理を5分間行い、再び溶媒を除去した。乾固した総脂質画分に精製水5 mlを加えてよく懸濁し、超音波処理を5分間行った。同じ処理を再度行い、あわせた懸濁液を4°Cで一晩透析した。凍結乾燥を行い、これを総脂質画分とした。

【0031】

得られた総脂質画分をCHCl₃/MeOH/H₂O (30/60/8, by vol.) 5 mlに溶かし、よく懸濁した後、超音波処理を5分間行った。同じ処理を再度行い、あわせた懸濁液を予め同じ溶媒で平衡化したDEAE-Sephadex A-25 (酢酸型、ゲル容積100 ml) カラムにアプライした。ゲル容積の10倍量のCHCl₃/MeOH/H₂O (30/60/8, by vol.) を流し、この画分を集めて中性糖脂質画分とし、溶媒を除去した。

【0032】

中性糖脂質画分に2 mlのCHCl₃/MeOH (1/1, by vol.) を加え、よく懸濁した。

【0033】

(a) 中性糖脂質画分のTLC分析

得られた中性糖脂質画分 (5 μ l)、phosphatidylethanolamine (PE) (1 μ l)、LacCer (Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer) (1 μ l)、Ceramide monohexioside (CMH: Glc β 1-1'Cer) (2 μ l)、Ceramide trihexoside (CTH: Gal α 1-3Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer) (2 μ l)、phosphatidylcholine (PC) (2 μ l)、phosphatidylserine (PS) (2 μ l)、phosphatidylinositol (PI, ウシ肝臓由来, SIGMA社) (2 μ l) をHPTLC上にスポットし、一度アセトンで展開し、風乾した後、CHCl₃/MeOH/12 mM MgCl₂ (60/35/8, by vol.) で展開し、1枚はOrcinol試薬を噴霧して110°Cに加熱し、1枚はDittmer試薬を噴霧し発色を行った。

【0034】

(b) 中性糖脂質画分の再アルカリ加水分解

中性糖脂質画分の溶媒を除去し、MeOH 5 mlを加えてよく懸濁した後、超音波

処理を5分間行った。10 N NaOH 50 μ lを加え、37°C、3時間インキュベートした。反応終了後、0.1 N AcOH 5 mlを加えて、よく懸濁し、超音波処理を5分間行い、再び溶媒を除去した。これに精製水5 mlを加え、よく懸濁し、超音波処理を5分間行った。同じ処理を再度行い、合わせた懸濁液を4°Cで一晩透析し、凍結乾燥した。

【0035】

(c) phospholipase C処理

中性糖脂質画分にはリン脂質が含まれていると考えられるため、PCが完全に加水分解される条件でphospholipase C処理を行った。

【0036】

まず、中性糖脂質画分 (50 μ l) とpositive controlとしてPC (5 μ l) をそれぞれ2本の試験管に取り、窒素気流下で蒸発固化し、ether/ethanol (98/2, by vol.) を100 μ lずつ加えた。1分間の超音波処理を行い、各試料の1本の試験管にはCaCl₂含有0.1 M Tris buffer (Tris(hydroxymethyl)aminomethane) (pH 7.2) で溶解したphospholipase C (Clostridium perfringens由来, SIGMA社) (0.1 mg/100 μ l) 溶液を、残りの1本には、CaCl₂含有0.1 M Tris buffer (pH 7.2)のみを100 μ lずつ加え、よく懸濁した後、25°Cの水浴にて3時間反応させた。

【0037】

反応終了後、溶媒を窒素気流下で除去し、生成物を逆相カラムで脱塩した。脱塩画分を窒素気流下で蒸発固化し、CHCl₃/MeOH (1/1, by vol.) を、中性糖脂質画分には30 μ l、PCには15 μ l加え、よく懸濁した後、TLCプレート (Polygram Si 1 G) 上にスポットした。TLCプレートを一度アセトンで展開し、風乾した後、CHCl₃/MeOH/12 mM MgCl₂ (50/40/10, by vol.) で展開し、1枚はOrcinol試薬を噴霧して110°Cに加熱し、1枚はDittmer試薬を噴霧し発色を行った。

【0038】

また、virus-binding assayを行った。

【0039】

図1に結果を示した。Phospholipase C処理によるvirus結合性の変化は認められなかった。Phospholipase C処理後においても、まだPC以外のリン脂質のバン

ドがいくつか観察されたことから、イアトロビーズカラムを用いて中性糖脂質画分をさらに4つの画分に精製した。

【0040】

中性糖脂質画分全量をphopholipase C処理し、反応液全量を4℃で一晩透析することで脱塩を行った。乾燥標品に対し、CHCl₃/MeOH (8/2, by vol.) を1 ml加え、懸濁し、超音波処理を5分間行った後、これをイアトロビーズカラムにかけ、①CHCl₃/MeOH (8/2, by vol.) 、②CHCl₃/MeOH/H₂O (65/25/4, by vol.) 、③CHCl₃/MeOH/H₂O (60/35/8, by vol.) 、④CHCl₃/MeOH/H₂O (50/40/10, by vol.) の4種の溶媒で連続して溶出し、中性糖脂質画分をさらに4つの画分に分けた。（各々、中性糖脂質画分I～IVとした。）

これらを窒素気流下で蒸発固化し、それぞれに1 mlのCHCl₃/MeOH (1/1, by vol.) を加え、うち5μlずつをTLCプレート (Polygram Sil G) にスポットした。プレートをアセトンでもう一度展開し、CHCl₃/MeOH/12 mM MgCl₂ (50/40/10, by vol.) で展開し、Orcinol試薬、Dittmer試薬を噴霧し発色した。

【0041】

(d) 中性糖脂質画分I～IVの化学分析およびvirus結合性の検討

前記(c)で得られた中性糖脂質画分I～IV (10μlずつ)、対照標品として、LacCer (1μl)、CTH (2μl)、paragloboside (PG: Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ1-1'Cer) (2μl)、GA₁ (Galβ1-3GalNAcβ1-4Galβ1-4Glcβ1-1'Cer) (2μl)、globoside (GalNAcβ1-3Galα1-4Galβ1-4Glcβ1-1'Cer) (2μl)をTLCプレート (Polygram Sil G) にスポットし、アセトンで一度展開した後、CHCl₃/MeOH/12 mM MgCl₂ (50/40/10, by vol.) で展開し、Orcinol試薬を噴霧して110℃に加熱し、発色した。中性糖脂質画分I～IVについて、前記の方法によりTLC/virus-binding assayを行った。

【0042】

結果を図2に示した。

【0043】

図2より、中性糖脂質画分I～IVのうち、中性糖脂質画分IIはvirusと強い結合性を示し、CTH、PG及びglobosideと呼ばれる中性糖脂質と非常に近い分子構造を

有していることが示唆された。

【0044】

(e) TLCプレートからの目的糖脂質のかきとり・抽出

そこで、virusとの結合性を示す部分をTLCプレートからかきとり、抽出を行い、目的物質を含む中性糖脂質画分を得た。

【0045】

TLCプレート (Polygram Sil G) を前処理としてCHCl₃/MeOH/H₂O (50/40/10, by vol.) で展開、風乾しておいた。中性糖脂質画分IIを窒素気流下で蒸発固化し、CHCl₃/MeOH (1/1, by vol.) を0.1 ml加え、その全量を1μl/mm laneとなるようにプレート上にスポットし、アセトンで一度展開後、CHCl₃/MeOH/12 mM MgCl₂ (50/40/10, by vol.) で展開した。

【0046】

TLCの両端を切り取り、Orcinol試薬を噴霧して110℃に加熱し、発色させた後、目的糖脂質のバンドを確認した。

【0047】

残ったプレート上のバンドに対応する部分をはさみで切り取り、切り取ったTLCプレートからシリカゲルをかきとり、これにCHCl₃/MeOH/H₂O (30/60/8, by vol.) で25 ml加え、1時間攪拌し、抽出を行った。抽出液を綿栓ろ過し、ろ液から溶媒を除去した。これにCHCl₃/MeOH (8/2, by vol.) 1 mlを加え、超音波処理を行い、パストールピペットに詰めたイアトロビーズカラム（ゲル容量1 ml）にアプライした。

【0048】

CHCl₃/MeOH (8/2, by vol.) を15 mlカラムに流し、この画分を集めた。（中性糖脂質画分II-1）

次に、溶出溶媒をCHCl₃/MeOH/H₂O (30/60/8, by vol.) に変え、20 mlカラムに流した。（中性糖脂質画分II-2）

それぞれの画分から溶媒を除去した後、0.5 mlのCHCl₃/MeOH (1/1, by vol.) を加えた。5μlずつTLCプレートにスポットし、アセトンで一度展開した後、CHCl₃/MeOH/12 mM MgCl₂ (50/40/10, by vol.) で展開し、Orcinol試薬を噴霧して1

10℃に加熱発色した。このとき対照標品として、PG、globoside、CTHも $2\mu l$ ずつTLC上にスポットした。

(2) 中性糖脂質画分に対するvirus結合性の解析

前記(1)の方法により得られた中性糖脂質画分II-2 ($10\mu l$)、PI ($10\mu l$)、PG ($2\mu l$)、globoside ($1\mu l$)をTLCプレート(Polygram Sil G)にスポットし、アセトンで一度展開した後、CHCl₃/MeOH/12 mM MgCl₂ (50/40/10, by vol.)で展開し、Orcinol試薬を噴霧して110℃に加熱し、発色させた。TLC/virus-binding assayを前記の方法により行った。

【0049】

結果を図3に示した。

【0050】

図3より、中性糖脂質画分II-2には、TLC上でPGと非常に近い位置に展開される糖脂質が含まれていること、さらにはこの糖脂質がDengue virusと強い結合性を示すことが確認された。また、対照標品であるPGに対しても、同様のvirus結合性が観察された。

(3) 中性糖脂質画分に含まれる結合性脂質の構造解析

以上より、Dengue virusと結合性を示す糖鎖分子がPGと非常に近い糖鎖構造をしていることが示唆された。そこで、抗PGモノクローナル抗体を用いて免疫化学分析を行った。

【0051】

(a) 免疫化学的分析

中性糖脂質画分II-2 ($10\mu l$) およびPG ($2\mu l$)をTLCプレート(Polygram Sil G)にスポットし、アセトン、CHCl₃/MeOH/12 mM MgCl₂ (50/40/10, by vol.)で連続的に展開した。TLCプレートを1% BSA-PBS (bovine serum albumin-phosphate buffered saline) 溶液中にて4℃で一晩ブロッキングした。1% BSA含有PBSで5000倍希釈した抗PGモノクローナル抗体(クローンH11) (5 ml)と1時間反応させた後、0.05% Tween 20を含むPBS (10 ml)で3分間洗浄し、これを5回繰り返した。洗浄終了後、1% BSA含有PBSで5000倍希釈したHRP (horseradish peroxidase) 標識ヤギ抗マウスIgG+IgM (5 ml) (American Qualex Antibodies社)

と1時間反応させた。プレートをPBS(-)で3分間洗浄し、これを5回繰り返し行った。最後に発色基質溶液 [0.1 M citrate buffer pH 6.0 (5 ml), 0.11 M 4-chloro-1-naphthol in CH₃CN (100 μl), 0.06 M DEPDA in CH₃CN (100 μl), 30 % H₂O₂ (10 μl)] と反応させ、スポットを検出した。

【0052】

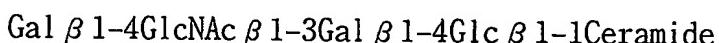
結果を図4に示した。

【0053】

図4より、中性糖脂質画分II-2には、PGと同一の糖脂質が含まれていることが判明した。

【0054】

以上より、K562細胞中のデングウィルス結合性脂質は、次式



(ただしGal: Galactose、GlcNAc: N-acetylglucosamine、Glc: glucose) で表されるパラグロボシド糖鎖構造を有する中性糖脂質であることが確認された。

<実施例2> Flow cytometerを用いたPGによるDengue virusのK562細胞表面への結合阻害効果の解析

K562細胞をコンフルエントまで培養した後、2 X 10⁵ cells/0.1 mlになるようマイクロチューブに分取した。これを4°C、10,000 rpmで2分間遠心後、得られた細胞のペレットを0.1 % BSA含有PBS 1 mlで1回洗浄した。Dengue virus液 (2000 units/ml) とPG (0, 100, 200, 500 μM) あるいは対照糖脂質であるGA₁ (500 μM) を0.1% BSA含有PBS中で4°C、1時間プレインキュベーションした後、それぞれK562細胞に100 μlずつ加え、4°Cで1時間、細胞へ結合させた。なお、virus(-)として、0.1% BSA含有PBSのみを同量加えた。反応終了後、冷PBS(-) 1 mlで細胞を3回洗浄し、一次抗体としてヒト抗flavivirus抗血清 (ロット#1) を200倍希釈して100 μlずつ加え、よく懸濁した後4°Cで30分間反応させた。冷PBS(-) 1 mlで細胞を3回洗浄し、二次抗体としてFITC標識ヤギ抗ヒトIgG (Zymed社) を50倍希釈して、100 μlずつ加え、遮光した後、4°Cで30分間反応させた。反応終了後、冷PBS(-) 1 mlで細胞を3回洗浄し、得られたペレットに対して0.5 mlの冷PBS(-) を加え、よく懸濁し、フローサイトメーター (Epics, U.S.A.)

で測定した。

【0055】

PGによるデングウィルスのK562細胞への結合阻害を調べ、PG濃度依存性を図5に示した。

【0056】

図5より、PGの濃度に依存してデングウィルスのK562細胞への結合が阻害されることが明らかになった。対照糖脂質であるGA₁は中性の4糖である点、さらに分子内の非還元末端にガラクトース残基を有する点から、PGと非常に類似した物性であった。しかし、GA₁は500μMの濃度においてもデングウィルスのK562細胞への結合を阻害できなかった。

【0057】

以上より、PGは、デングウィルスと特異的に結合し、この特異的結合によりウイルスの宿主細胞への吸着が阻害されていることが明らかになった。

【0058】

【発明の効果】

以上詳しく述べたとおり、この出願の発明により、デング熱ウイルスへの感染を効果的に防止できるデング熱ウイルス感染阻害剤が提供される。

デング熱は第4類感染症に指定されているにも関わらず、これまでその効果的な治療法が確立されておらず、原因微生物であるデングウィルスの宿主への感染機構についても不明な点が多くあった。

この出願の発明により、初めてデング熱ウイルス感染阻害剤が実現したが、これは同時に、デング熱ウイルスへの感染による細胞応答の分子機構の解明や、より効果の高い抗デング熱剤の開発など、さらなる展開への足がかりとしての有用性が高い。

【図面の簡単な説明】

【図1】

この出願の発明の実施例において、phospholipase C処理後のK562細胞の中性等脂質画分のTLC分析およびvirus結合性の結果を示した図である。（a:Dittmer試薬噴霧、b:Orcinol試薬噴霧、c:virus-binding assay；1:中性糖脂質

画分（未処理）、2：中性糖脂質画分（phospholipase C (+)）、3：中性糖脂質画分（phospholipase C (-)）、4：phosphatidylcholine（phospholipase C (+)）、5：phosphatidylcholine（phospholipase C (-)）；展開溶媒：CHCl₃/MeOH/12 mM MgCl₂ (50/40/10, by vol.)；使用プレート：Polygram Sil G)

【図2】

この出願の発明の実施例において、K562細胞の中性糖脂質画分I～IVに対するvirus結合性の結果を示した図である。（a：Orcinol試薬噴霧、b：virus (-)、c：virus (+)；1：中性糖脂質画分I、2：中性糖脂質画分II、3：中性糖脂質画分III、4：中性糖脂質画分IV、5：LacCer、6：CTH、7：paragloboside、8：GA₁、9：globoside；展開溶媒：CHCl₃/MeOH/12 mM MgCl₂ (50/40/10, by vol.)；使用プレート：Polygram Sil G）

【図3】

この出願の発明の実施例において、K562細胞の中性糖脂質画分II-2に対するvirus結合性の結果を示した図である。（a：Orcinol試薬噴霧、b：virus (+)；1：中性糖脂質画分II-2、2：phosphatidylinositol、3：paragloboside、4：globoside；展開溶媒：CHCl₃/MeOH/12 mM MgCl₂ (50/40/10, by vol.)；使用プレート：Polygram Sil G）

【図4】

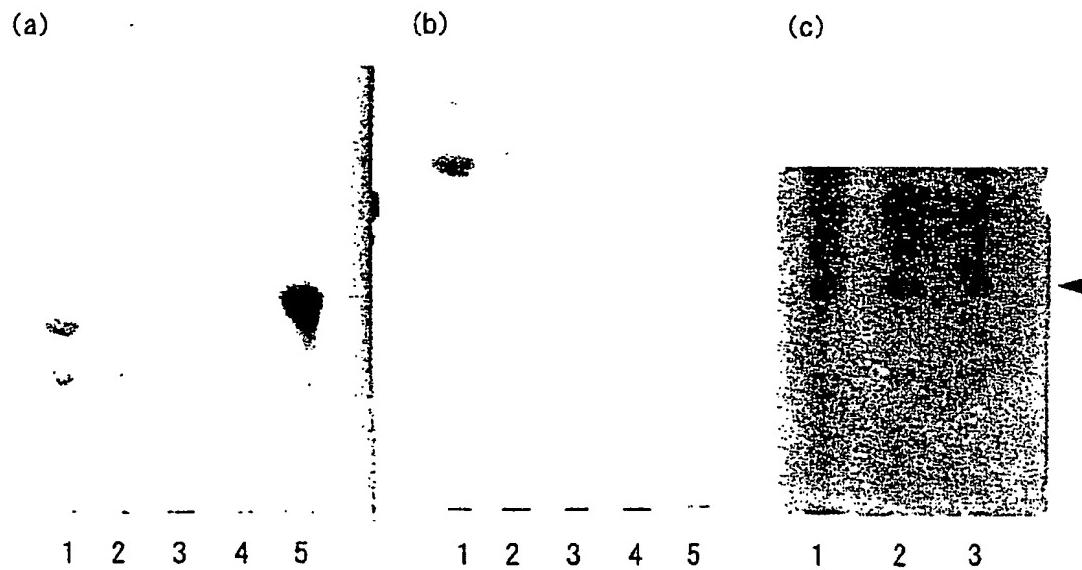
この出願の発明の実施例において、抗PGモノクローナル抗体（H11）によるK562細胞精製糖脂質画分の免疫化学的検出の結果を示した図である。（1：paragloboside、2：中性糖脂質画分II-2；展開溶媒：CHCl₃/MeOH/12 mM MgCl₂ (50/40/10, by vol.)；使用プレート：Polygram Sil G）

【図5】

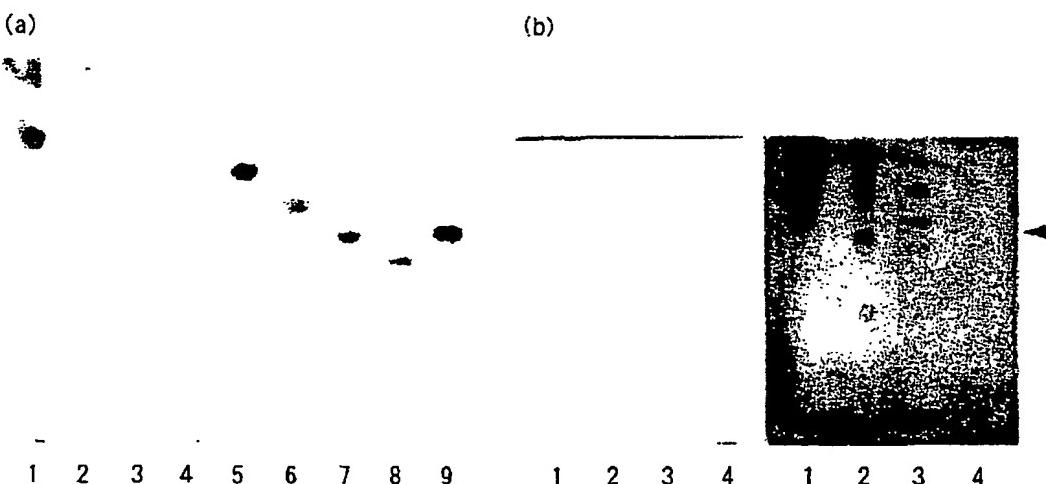
この出願の発明の実施例において、パラグロボシドによるデングウィルスのK562細胞への結合阻害効果の解析結果を示した図である。（a：virus (+)、b：virus (-)、c：paragloboside 100 μM、d：paragloboside 200 μM、e：paragloboside 500 μM、f：GA₁ 500 μM）

【書類名】 図面

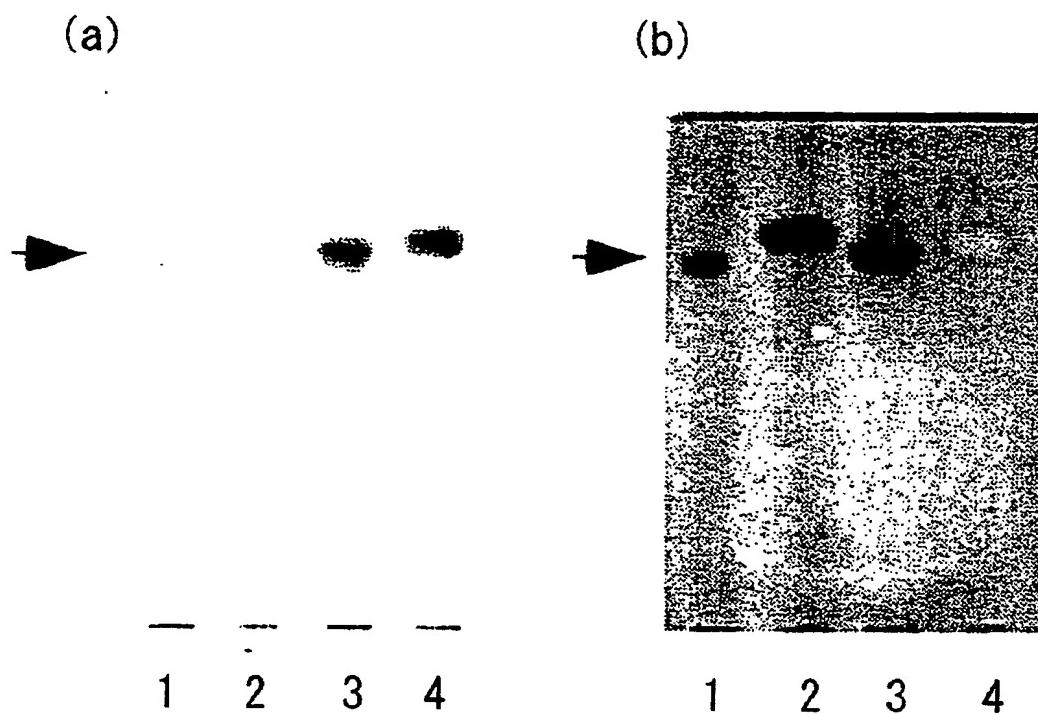
【図 1】



【図 2】



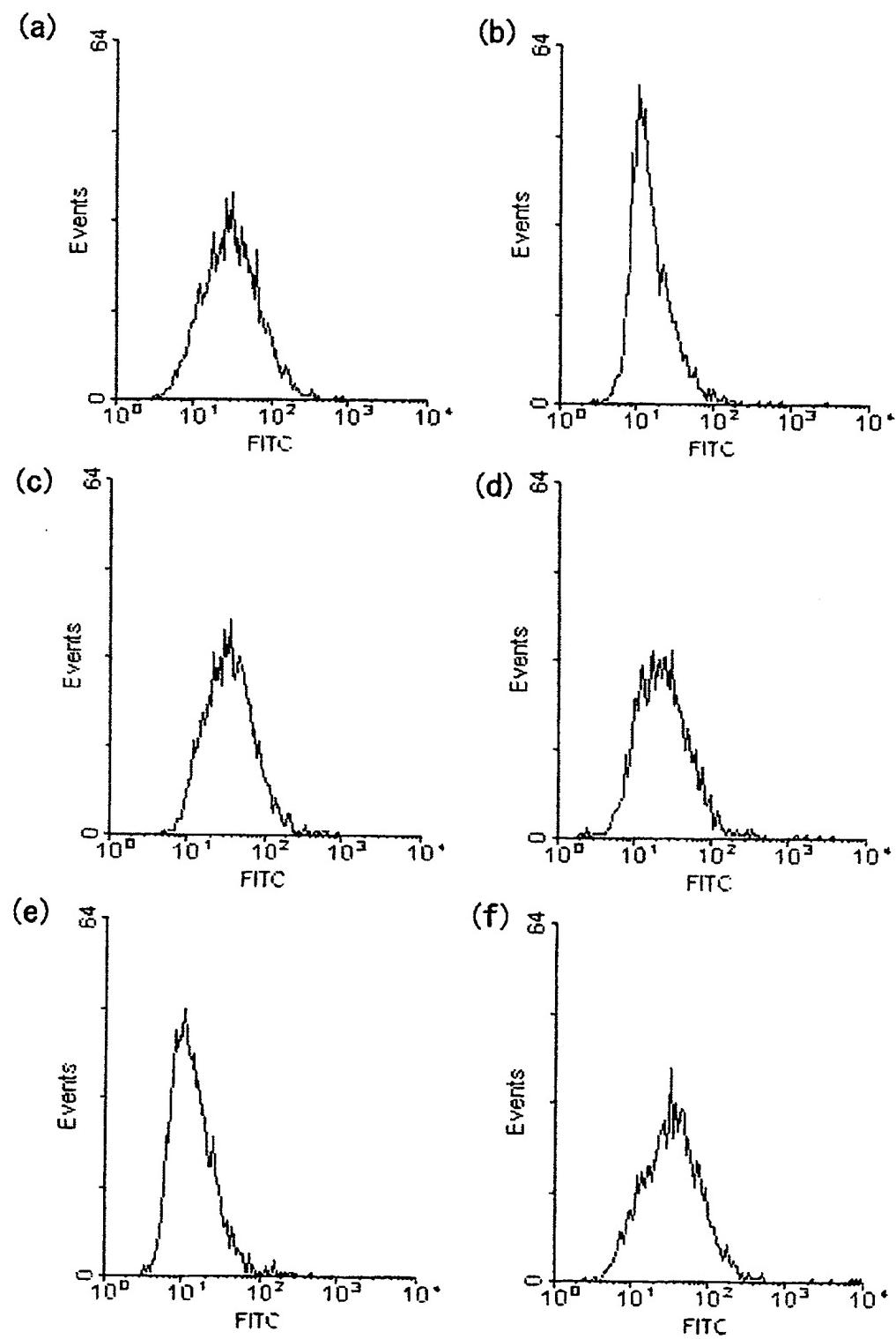
【図3】



【図4】



【図5】

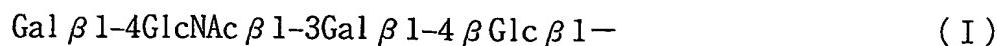


【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 デング熱ウィルスの感染を効果的に阻害する薬剤を提供する。

【解決手段】 少なくとも、次式（I）



で表されるパラグロボシドを必須構成要素として有する糖質分子を有効成分として含有するデング熱ウィルス感染阻害剤とする。

【選択図】 なし

特願 2002-307232

出願人履歴情報

識別番号

[396020800]

1. 変更年月日 1998年 2月24日
[変更理由] 名称変更
住 所 埼玉県川口市本町4丁目1番8号
氏 名 科学技術振興事業団